

二氢杨梅素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外抗增殖作用

周防震^{1*}, 张晓元¹, 孙奋勇², 郭 勇¹

关键词: 二氢杨梅素; 人乳腺癌细胞; 抗增殖; 细胞凋亡; 金属基质蛋白酶

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)01-0095-03

0 引言

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY), 化学名为 3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3 双氢黄酮醇, 是从藤茶(*Ampelopsis grossedentata*)等植物茎叶中提取的一种二氢黄酮醇化合物。研究表明 DMY 具有抗氧化、镇痛、止咳、广谱抑菌、保肝护肝、降血糖、降血脂、增强人体免疫力等多种生理活性^[1], 且安全低毒。从体外细胞毒抑制实验结果看, 二氢杨梅素对人乳腺癌 MCF-7 细胞、鼻咽癌 HK-1 细胞、人肝癌 Bel-7402 细胞、白血病 HL-60、K562 细胞和肺癌 H1299 细胞^[2-4] 都有较强的抑制作用。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 且发病率高, 居女性恶性肿瘤的首位^[3]。目前临床上乳腺癌抗癌药物的选择性差, 不良反应大, 使得化疗药物的使用受到一定限制, 并且, 肿瘤转移是引起癌症患者死亡的主要原因之一。因此需要开发新型的高效、低毒、可抑制肿瘤转移的药物。有关 DMY 对高转移性乳腺癌细胞增殖作用的实验研究尚不多。我们以人乳腺癌高转移细胞 MDA-MB-231 为对象, 研究离体条件下 DMY 对肿瘤细胞的抗增殖作用, 并探讨其可能的作用机制及 DMY 作为抗癌辅助药物的潜能。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7、MCF-7/A 和 MDA-MB-231 由暨南大学生物工程研究所馈赠。二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)由华南理工大学工业研究院自制, 纯度 99%, 用 DMSO 配置成浓度为

32 mg/ml 的储备液, 使用时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。DMSO 在各组培养液中的终浓度均为 0.01%。MTT、DMSO、明胶为 Sigma 公司产品, DMEM 培养液、FBS 为 Hyclone 公司产品, 培养板和培养瓶购于 Corning 公司, BCA 蛋白质定量测定试剂盒购于碧云天生物技术公司。组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒购于东盛生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞用含 2 nmol/L 谷氨酰胺、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素以及含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞长满培养瓶底时, 0.125% 胰酶消化成单个细胞传代。取对数生长期细胞进行实验, 实验前倒置显微镜下观察, 形态良好、无退化。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 以每孔 5×10^3 的密度(MDA-MB-231 为 3×10^3 /孔)将指数增殖期细胞接种于 96 孔板内, 培养液为含 10% FBS 的 DMEM。培养 24 h 后, 吸出培养液, 每孔加入 200 μl 含不同浓度 DMY 的培养液, 每个浓度设 6 个复孔。另设空白对照组。细胞置 37℃ 培养箱内培养 48 h 后每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl, 继续培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 DMSO 100 μl, 置振荡仪上充分混匀。采用酶标仪, 以 570 nm 为测试波长, 630 nm 为参考波长, 测量各孔吸光度, 计算细胞生长抑制率。抑制率为: (对照组 A 值 - 实验组 A 值)/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡 收集 6 孔培养板中不同浓度 DMY 作用 48 h 的细胞制成单细胞悬液, 用碘化丙啶染色, 上机, 用 Becton Dickinson 公司的 FACS Calibur 型流式细胞仪测定细胞周期和凋亡率, 激发波长 488 nm, 并用随机所附软件进行结果分析, 实验重复 3 次。

1.2.4 MMP-2 和 MMP-9 活性检测 参考侯晓丽等^[4]的方法, 将细胞接种于 6 孔培养板, 调节细胞数量为 2×10^5 个/孔, 每孔液体总体积 2 ml。DMY 各

收稿日期: 2011-03-01; 修回日期: 2011-05-30

基金项目: 广东省教育部产学研结合资助项目(2009B090600115)

作者单位: 1. 510006 广东广州, 华南理工大学生物科学与工程学院(*: 现工作单位: 445000 湖北恩施, 湖北民族学院生物科学与技术学院); 2. 暨南大学生物工程研究所

通信作者: 张晓元, E-mail: xzyh@scut.edu.cn

作者简介: 周防震(1976-), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然产物开发与应用方面的研究

处理组(0、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)处理 48 h 后收集各组细胞培养上清液,按试剂盒说明进行 BCA 法蛋白定量。取等蛋白含量各组样本液,加入同体积上样缓冲液,按固定顺序加样于含 0.1% 明胶的 SDS-PAGE 凝胶孔中,80 V 电压电泳,待蛋白进入分离胶后,改为 120 V 继续电泳至溴酚蓝到达分离胶底部。取下凝胶,置于洗脱液(2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.6)中洗脱 2 次,每次 30 min,然后用漂洗液(50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.6)漂洗 10 min,换为培养液(50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, pH 7.5),37℃ 温箱 50 r/min 振荡培养 40 h。0.1% 考马斯亮蓝染色,脱色(30% 甲醇,10% 乙酸)至蓝色背景下白色条带清晰可见。低分子质量标准蛋白质的组成:磷酸化酶 b 94 kD,牛血清白蛋白 62 kD,卵清蛋白 40 kD,碳酸酐酶 30 kD,胰蛋白酶抑制剂 20 kD,溶菌酶 12 kD。实验重复 3 次,用 Image J 软件对明胶酶谱图实验结果进行扫描分析。

1.3 统计学方法

统计学处理应用 SPSS 16.0 软件,LSD 检验进行统计分析,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

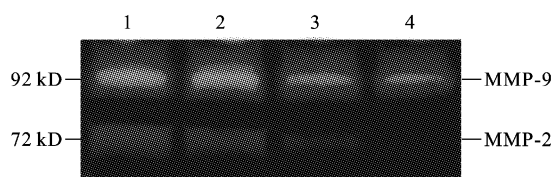
2 结果

2.1 不同人乳腺癌细胞对 DMY 敏感度比较

DMY 处理人 MCF-7、MCF-7/A 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 48 h 均能显著抑制肿瘤细胞的增殖($P < 0.01$),且表现出明显的剂量依赖关系,不同肿瘤细胞株对 DMY 的反应敏感度不同,分别是 MDA-MB-231 > MCF-7/A > MCF-7,见图 1,其 IC_{50} 分别为 73.6 $\mu\text{g/ml}$ 、108.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 227.4 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 DMY 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的细胞周期及细胞凋亡的影响

40 和 80 $\mu\text{g/ml}$ DMY 处理能诱导细胞周期阻滞于 G_2/M 期并伴随显著的细胞凋亡,见表 1。



(1: control group, 2, 3, 4: 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ DMY treatment group, respectively)

图 2 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 分泌 MMP-2 和 MMP-9 的明胶酶谱分析

Figure 2 Zymography analysis of MMP-2 and MMP-9 secreted by human breast cancer cell MDA-MB-231

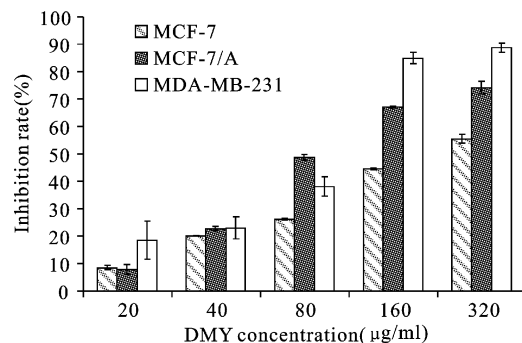


图 1 DMY 对几株人乳腺癌细胞的体外抗增殖作用

Figure 1 Antiproliferative effect of DMY on different human breast cancer cell lines *in vitro*

表 1 不同浓度二氢杨梅素对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

Table 1 Effects of dihydromyricetin

on MDA-MB-231 cell cycle and apoptosis

DMY ($\mu\text{g/ml}$)	G_0/G_1 (%)	S (%)	G_2/M (%)	Apoptosis (%)
0	55.3 $\pm$ 1.4	35.9 $\pm$ 1.7	8.8 $\pm$ 1.0	2.8
20	55.0 $\pm$ 2.4	36.9 $\pm$ 1.2	8.1 $\pm$ 0.6	2.2
40	47.6 $\pm$ 1.6*	37.0 $\pm$ 1.4	15.4 $\pm$ 0.1**	4.7**
80	41.9 $\pm$ 2.7**	35.5 $\pm$ 2.1	22.6 $\pm$ 0.2**	9.8**

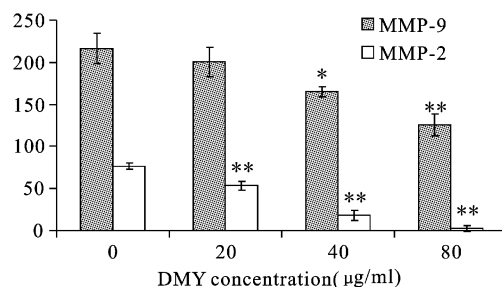
Note: compared with 0 $\mu\text{g/ml}$ DMY, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

2.3 DMY 对 MDA-MB-231 细胞 MMP-2 和 MMP-9 活性的影响

40 和 80 $\mu\text{g/ml}$ 的 DMY 处理可以同时降低乳腺癌细胞 MDA-MB-231 培养液上清中基质金属蛋白酶 MMP-9 和 MMP-2 的活性,20、40 和 80 $\mu\text{g/ml}$ 的 DMY 处理均能显著降低 MMP-2 的活性($P < 0.01$),且呈浓度梯度关系,见图 2。

3 讨论

快速增殖是癌细胞的主要特征之一,遏制癌细胞快速增殖是控制癌症发展的重要途径。大量实验结果表明,黄酮和黄酮醇类物质对多种癌细胞表现



出细胞增殖抑制活性^[5-9],本实验首次证明 DMY 以剂量依赖方式抑制乳腺癌 ER 阴性高转移细胞 MDA-MB-231 的增殖。从 DMY 抑制 3 株人乳腺癌细胞增殖的总体趋势可以看出,癌细胞对 DMY 的敏感度依次为 MDA-MB-21>MCF-7/A>MCF-7,表明 DMY 对不同癌细胞的增殖抑制活性可能具有细胞类型选择性。DMY 处理后细胞培养液中 MMP-2 和 MMP-9 活性的降低,则暗示 DMY 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭转移抑制作用。MDA-MB-231 是人乳腺癌 ER 阴性高转移细胞,传统的抗激素疗法效果较差。DMY 对 MDA-MB-231 细胞增殖抑制的相对敏感度以及对其侵袭转移的抑制作用,暗示 DMY 具有开发为抗人乳腺癌细胞转移辅助药物的巨大潜能。

细胞增殖的过程也是细胞周期循环的过程,因此细胞增殖的抑制很可能是细胞周期循环阻滞的结果。本实验中 FCM 结果表明 40 和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DMY 诱导了 MDA-MB-231 细胞的周期循环阻滞于 G_2/M 期。由于 G_2/M 期阻滞可以增加损伤 DNA 的修复,减少染色体畸变^[6],说明 DMY 选择性作用于 MDA-MB-231 细胞的 G_2/M 期并参与细胞周期的调控。在其他类型癌细胞(如前列腺癌细胞、白血病细胞以及结肠癌细胞)的相关研究中,亦发现黄酮和黄酮醇的 G_2/M 期细胞周期停滞的诱导活性^[7-8]。同时 FCM 结果显示 40 和 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DMY 处理 48 h,可见明显的亚二倍体峰(数据未列出),表明 DMY 处理能诱导癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡。在光学显微镜下观察发现细胞形态发生明显变化,对照组细胞生长贴壁良好,细胞间隙小,呈片状生长;经 DMY 处理后,随着 DMY 浓度的递增,细胞数量明显减少,与周围细胞间的黏附减少,细胞间隙变大,细胞皱缩变圆,以致细胞从瓶壁大片脱落,出现坏死和凋亡小体。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DMY 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,没有检测到明显的细胞周期阻滞和凋亡,但能显著抑制细胞增殖,表明 DMY

对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制,还存在其他的机制,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang YS, Ning ZX, Yang WL. Tengcha Xue[M]. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 2003: 220-265. [张友胜, 宁正祥, 杨伟丽. 藤茶学[M]. 广州: 广东科技出版社, 2003: 220-265.]
- [2] Zhou NN, Zhu XF, Xie BF, et al. Study on the anti-tumor action of ampelopsin from ampelopsis cantoniensis planch[J]. Guangdong Pharm J, 200, 10(4): 7-8. [周宁宁, 刘德育. 无刺根中蛇葡萄素体外抗肿瘤作用研究[J]. 广东药学, 2000, 10(4): 7-8.]
- [3] Zhen LL, Wu ZY, Fan P, et al. Establishment of human breast carcinoma model in nude mice[J]. J Nanjing Med Univ, 2001, 6(21): 509-510. [甄林林, 武正炎, 范萍, 等. 人乳腺癌裸鼠移植模型的建立[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2001, 6(21): 509-510.]
- [4] Hou XL, Han M, Wang YQ, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and effect on invasion of two gastric cancer cell lines[J]. Cancer Res Prev Treat, 2010, 37(1): 12-15. [侯晓丽, 韩梅, 王玉巧, 等. 胃癌细胞基质金属蛋白酶-2、9 的表达及对细胞迁移的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(1): 12-15.]
- [5] Lim do Y, Jeong Y, Tyner AL, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(1): G66-G75.
- [6] Shao HL, Xin H, Zhai YM, et al. Apoptosis of hepatoma BEL-7402 cell line induced by allicin[J]. Acta Anatomica sinica, 2001, 32(3): 290-292. [邵红莲, 辛华, 翟玉梅, 等. 大蒜素诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡[J]. 解剖学报, 2001, 32(3): 290-292.]
- [7] Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, et al. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006, 9(1): 68-76.
- [8] Kuo HM, Chang LS, Lin YL, et al. Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway[J]. Anticancer Res, 2007, 27(1A): 395-405.

[编辑: 黄国玲; 校对: 杨 卉]